

HIPERFENILALANINEMIA y FENILCETONURIA

1-INTRODUCCION

La fenilcetonuria (phenylketonuria o PKU) es una enfermedad genética que sigue un patrón de herencia autosómico recesivo (OMIM 261600). Se debe a una deficiencia en la función de la fenilalanina hidroxilasa (fenilalanina 4-monooxigenasa, PAH, EC.1.14.16.1), primera enzima limitante en el catabolismo de la fenilalanina. Su deficiencia da lugar a una acumulación de fenilalanina en sangre y tejidos (hiperfenilalaninemia) y a un aumento en la eliminación de sus metabolitos en orina (fenilcetonuria).

La fenilalanina (Phe) es un aminoácido esencial que compone aproximadamente el 5% de las proteínas de origen natural y que se absorbe a nivel intestinal de forma competitiva con otros aminoácidos neutros. La hidroxilación de la fenilalanina consume aproximadamente el 60-75% de la Phe procedente de la dieta y de la degradación tisular de proteínas, mientras que el 25-40% restante se utiliza para la regeneración de proteínas endógenas.

Hiperfenilalaninemia es un término genérico dado a una concentración de fenilalanina plasmática elevada de forma persistente sobre la distribución normal de los valores en plasma. Los valores normales de la fenilalanina en plasma, independientemente de la edad, son aproximadamente de 60 $\mu\text{mol/L}$ (1mg/dl). Los niveles varían a lo largo del día pero dentro de límites muy estrechos. Los niveles de la fenilalanina en sangre y los distintos tejidos tienen escasas diferencias y se encuentran siempre en equilibrio homeostático. Los individuos con un defecto en el sistema de hidroxilación de la fenilalanina tienen niveles en sangre superiores a 120 $\mu\text{mol/L}$ (2mg/dl), siendo más elevados cuanto menor sea la actividad residual de las enzimas implicadas. Los niveles elevados de fenilalanina actúan por diferentes mecanismos como tóxicos cerebrales produciendo muerte o apoptosis neuronal progresiva, dando lugar a diferentes grados de alteración en el desarrollo cognitivo de las personas afectadas. La manifestación clínica más importante de la hiperfenilalaninemia es por tanto el retraso mental moderado-severo. También se puede acompañar de palidez de piel, eccemas pruriginosos y un olor característico a ratones o paja mojada de las secreciones corporales cuando los niveles de fenilalanina son extremadamente elevados y se transforman en fenilacético.

Cualquier defecto en la actividad del sistema de hidroxilación de la fenilalanina puede dar lugar a una hiperfenilalaninemia, pero aproximadamente el 98% de las

hiperfenilalaninemias están asociadas a deficiencias en la función de la fenilalanina hidroxilasa.

La incidencia de esta enfermedad es dependiente de la zona geográfica de estudio, para Europa es de 1:10000 recién nacidos (Scriver and Kaufman 2001) y la estimación de portadores por lo tanto es 1 de cada 50 individuos. Algunas características de la enfermedad se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Tabla N°1: Fenilcetonuria (OMIM261600)		
Características clínicas, bioquímica, diagnóstico y tratamiento.		
CLÍNICA	BIOQUÍMICA	DIAGNÓSTICO
En los casos más graves, no tratados, se produce alteración en las funciones y desarrollo cerebral.	- Hiperfenilalaninemia - Elevación de metabolitos derivados de la fenilalanina: OH-fenilacético, fenilpirúvico, feniláctico, ácido mandélico.	-Niveles de fenilalanina y otros aa en el plasma. -Análisis de pterinas -Medida actividad de DHPR en papel o sangre -Mutaciones en el gen PAH
TRATAMIENTO: <ul style="list-style-type: none"> ⊗ El tratamiento clásico es una restricción en la dieta del aminoácido fenilalanina. ⊗ FDA aprueba Kuvan®, sapropterina. ⊗ FDA aprueba terapia de sustitución de enzimas: Palynziq. 		

La primera descripción de la enfermedad fue hecha por Asbjörn Fölling en 1934, al estudiar dos hermanos con retraso mental que excretaban en orina cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico, por lo que llamó a esta patología “oligofrenia fenilpirúvica”. En 1939 Penrose confirmó la enfermedad, a la que rebautizó como Fenilcetonuria, y describió su herencia autosómica recesiva. En 1947, Jervis postuló que el defecto metabólico de la fenilcetonuria consistía en la imposibilidad de oxidar la fenilalanina a tirosina, y en 1953 demostró la deficiencia de fenilalanina hidroxilasa en el hígado de un paciente. Ese mismo año Bickel consiguió un hidrolizado de proteínas bajo en fenilalanina y pudo tratar a varios pacientes con una dieta que redujo los niveles de fenilalanina en sangre. Esta dieta consiguió una mejoría del desarrollo mental y del comportamiento de los pacientes, incluso previniendo totalmente el daño neurológico si el tratamiento se iniciaba en el periodo neonatal. A partir de ese momento se inician los programas de detección precoz de la hiperfenilalaninemia y se extiende su tratamiento mediante dietas limitadas en fenilalanina. La cantidad de fenilalanina que cada paciente tolera en su dieta fue el

parámetro utilizado por Güttler en 1980 para determinar la severidad de cada caso y clasificarlos en distintos fenotipos.

2- SISTEMA DE HIDROXILACION DE FENILALANINA

El término de hiperfenilalaninemia se refiere a niveles de fenilalanina en sangre superiores de forma persistente a 2,5 mg/dl ($> 150 \mu\text{mol/L}$), y que son secundarios a una alteración en la reacción enzimática de hidroxilación de fenilalanina.

El sistema de hidroxilación de fenilalanina (Figura 1) consta de dos enzimas, fenilalanina hidroxilasa (PAH: EC 1.14.16.1) y dihidropterina reductasa (DHPR: EC 1.6.99.10), y un cofactor no proteico llamado tetrahidrobiopterina (BH_4). La BH_4 se sintetiza a partir de guanosin trifosfato (GTP) a través de tres reacciones enzimáticas, guanosin trifosfato ciclohidrolasa (GTP-CH: EC 3.5.4.16), 6-piruvil tetrahidrobiopterina sintasa (PTPS: EC 4.6.1.10) y sepiapterina reductasa (SR: EC 1.1.1.153). La PAH cataliza la hidroxilación de fenilalanina convirtiéndola en tirosina, siendo el donador de electrones la BH_4 que, a su vez, se oxida convirtiéndose en dihidrobiopterina (qBH_2). La qBH_2 se reduce de nuevo a BH_4 , a través de la reacción catalizada por la dihidropterina reductasa (DHPR: EC 1.6.99.7). La oxidación de qBH_2 a BH_4 , se facilita "in vivo" con una deshidratasa, carbinolamina deshidratasa (PCD: EC 4.2.1.96) que hace perder una molécula de agua a un compuesto intermedio denominado carbinolamina.

a) Si el defecto enzimático se encuentra en la PAH, se afecta exclusivamente la hidroxilación hepática de la fenilalanina, dando lugar a un grupo de enfermedades conocidas como Hiperfenilalaninemias por deficiencia de PAH en las que la concentración de fenilalanina en fluidos y tejidos, especialmente en el sistema nervioso central, aumenta cuanto menor es la actividad PAH residual hepática. Si la fenilalaninemia es superior a 600 micromoles/L ($>10 \text{ mg/dl}$), se produce daño cerebral y apoptosis neuronal, que es mayor cuanto mayor es la concentración de fenilalanina, condicionando un fenotipo de retraso mental grave.

b) Cuando el defecto enzimático se encuentra en alguna de las enzimas de los sistemas de síntesis y/o de reciclaje de BH_4 , no solo se afecta el sistema de hidroxilación de fenilalanina, sino que también lo hace el sistema de hidroxilación de tirosina y de triptofano, dando lugar a un defecto de síntesis de L-DOPA (3-5 dihidroxifenilalanina) y de 5-hidroxitriptofano (5HT) precursor de la serotonina

(Figs. 1 y 2). Es decir, se afecta la síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos dando lugar a un grupo de enfermedades conocidas como hiperfenilalaninemias por defecto del cofactor BH4.

Estas diferencias en su fisiopatología hacen indispensable el diagnóstico diferencial de la causa de una hiperfenilalaninemia persistente para establecer el tratamiento adecuado.

El sistema de hidroxilación de la fenilalanina es la primera etapa en el catabolismo de este aminoácido. La enzima PAH cataliza la parahidroxilación del aminoácido L-fenilalanina para dar L-tirosina, en presencia de tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor y de oxígeno molecular como cosustrato (Figura 1).

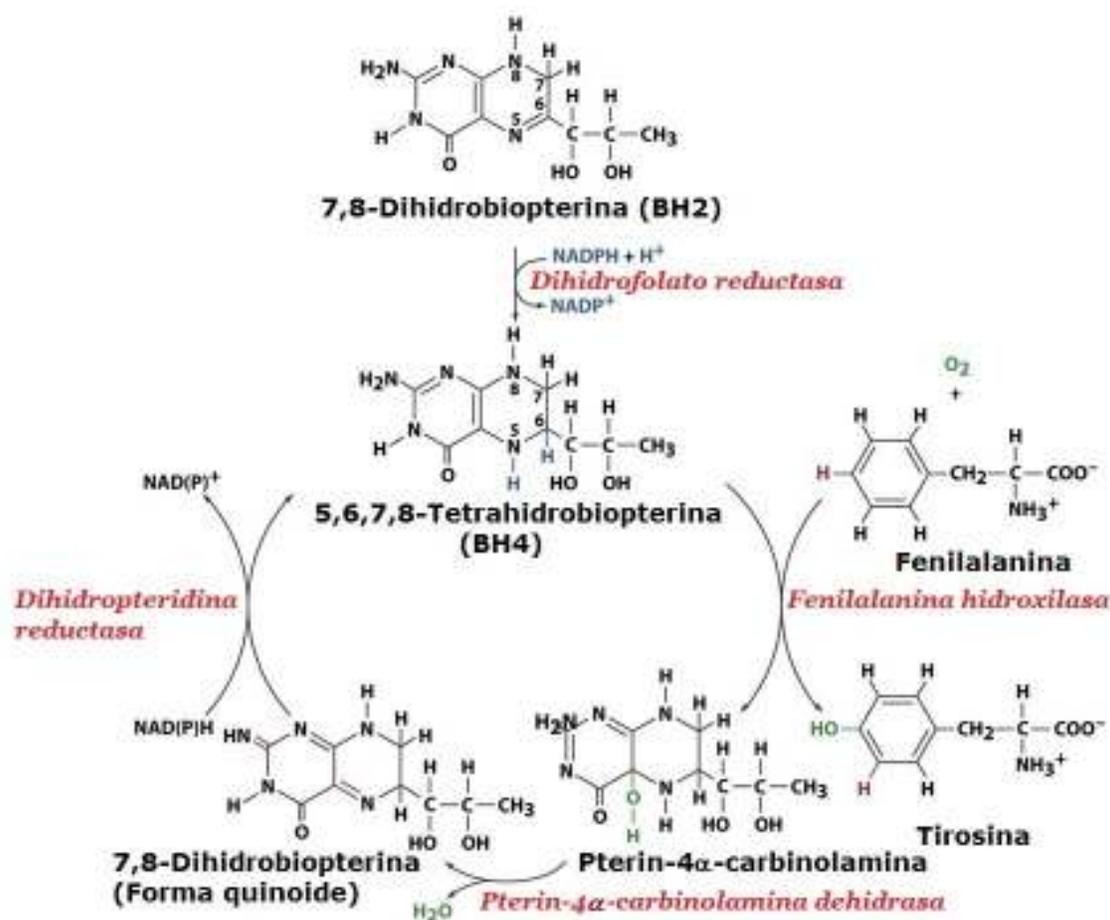


Figura 1- Sistema de hidroxilación de la fenilalanina y recuperación de BH4.

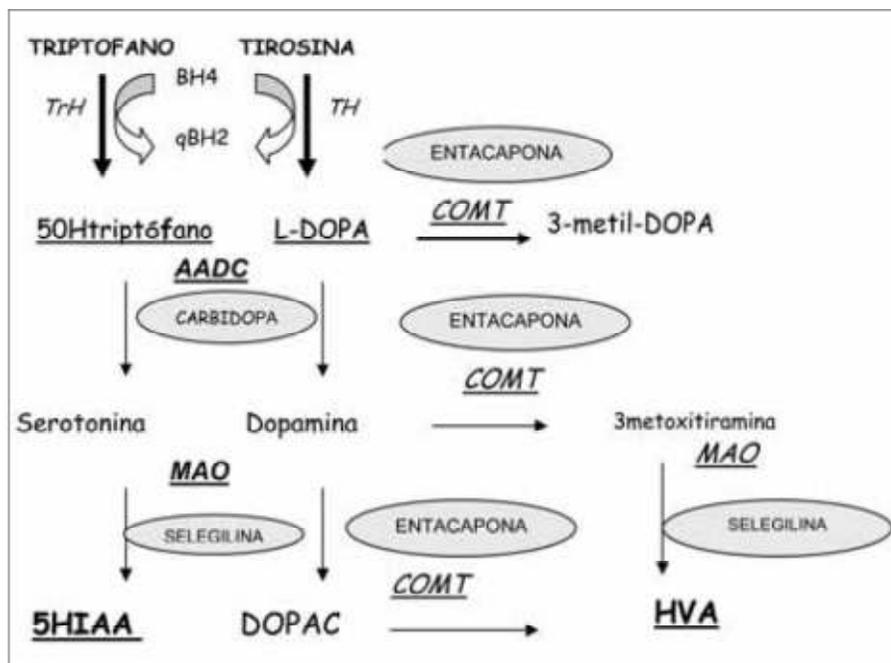
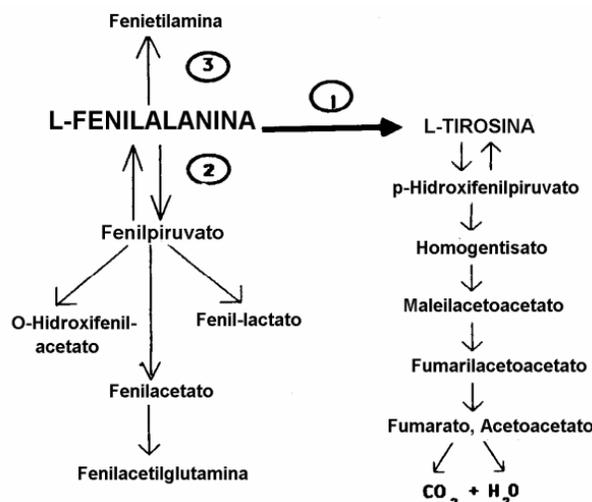


Figura 2. Síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos a nivel del sistema nervioso central, a partir de la oxidación del triptófano y de la tirosina con tetrahidrobiopterina (BH4). AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos; COMT: catecolamina metil transferasa; MAO: monoamino oxidasa; 5HIAA: 5 hidroxil indol acético; HVA: homovanílico. La carbidopa inhibe a la AADC, la selegilina inhibe a la MAO y la entacapona inhibe a la COMT.

La PAH requiere una adecuada concentración de BH4 (Km), por lo que su actividad depende del funcionamiento de las dos enzimas que regeneran el cofactor a partir de su forma reducida, la 4 α -carbinolamin-deshidratasa (PCD) y la dihidropterina reductasa (DHPR), así como de la actividad de las distintas enzimas que componen la ruta de biosíntesis intracelular de BH4. **La primera enzima de esta ruta de biosíntesis es la GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), que es activada por la Phe e inhibida por su producto final, la BH4 (Figura 1).**

El acúmulo de fenilalanina activa otras rutas metabólicas alternativas que producen unos metabolitos indetectables en condiciones normales y que se eliminan por orina y distintos fluidos corporales. Uno de ellos es el ácido fenilacético, que da el olor característico de los pacientes, y otro el ácido fenilpirúvico detectado por Fölling.



Las Vías Metabólicas de Fenilalanina (excluyendo su incorporación a proteínas) son: (1) Su hidroxilación, mediada por FAH (mayor), (2) Transaminación (menor) y (3) su decarboxilación (menor). En fenilcetonuria adquiere importancia la transaminación, para dar Ácidos Fenilacético, Fenilpirúvico y Fenil-láctico, el primero es el responsable del olor característico de la orina.

3- ESTRUCTURA, FUNCION Y REGULACION DE LA PAH

La enzima PAH forma parte de la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, que utilizan la BH₄ como cofactor y que requieren un átomo de hierro en su estructura para ser funcionales. Debido a que la PAH humana es difícil de estudiar por su rápida degradación post-mortem, la mayoría de los estudios de estructura y función se han realizado en PAH purificada de hígado de rata, con la que guarda una similitud del 92%. En humanos se expresa fundamentalmente en el hígado, aunque algunos estudios indican que también se expresa minoritariamente en el riñón y en los melanocitos. Distintos estudios han demostrado la existencia de tres dominios funcionales en la proteína (Figura 3):

1) Dominio regulador (residuos 1-110 desde el extremo amino-terminal): dada la importancia fisiológica del sistema de hidroxilación de la Phe, la enzima está fuertemente regulada y tiene como activador alostérico los niveles de Phe y como inhibidor los niveles de BH₄, dependiendo además de la fosforilación-defosforilación del residuo Ser16.

2) Dominio catalítico (residuos 111-410): en él se halla el centro activo de la enzima, con el átomo de hierro y los sitios de unión del sustrato y el cofactor.

3) Dominio de oligomerización (residuos 411-452): para su actividad, la enzima debe ensamblarse en forma de dímero y sobre todo en forma de tetrámero, que tiene una actividad cinco veces superior. La formación de estos tetrámeros se ve favorecida en presencia de BH₄.

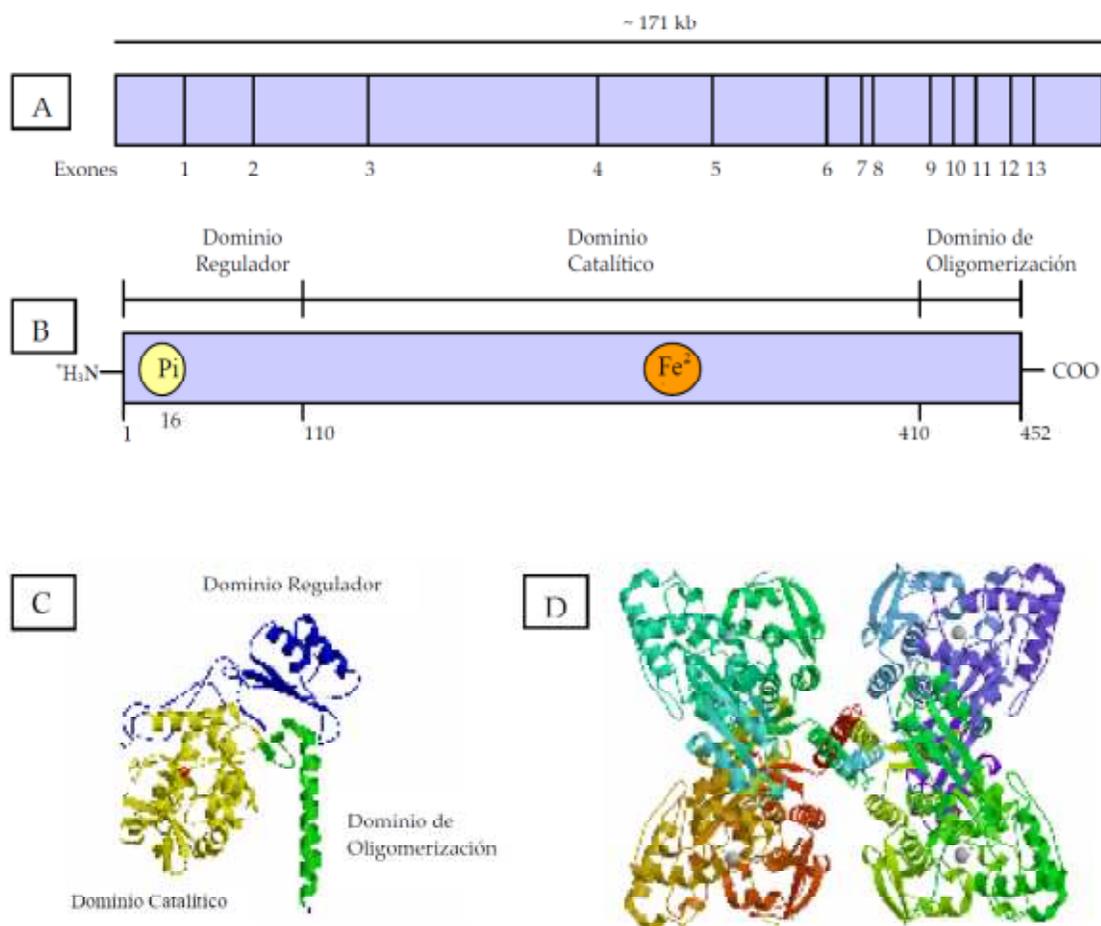


Figura 3- Organización estructural del gen y la proteína PAH. A) Estructura del gen PAH; B) Estructura primaria de la proteína PAH, donde se localizan los dominios funcionales, el átomo de hierro y el sitio de fosforilación (Ser16); C) y D) Modelos tridimensionales propuestos para la PAH en forma monomérica (C) y tetramérica (D). Tomado de: Pey, 2004; Erlandsen y Stevens, 1999; Konecki y Lichter-Konecki, 2001; Scriver y Kaufman, 2001.

4- GEN PAH. EXPRESION DE MUTACIONES. RELACION GENOTIPO/FENOTIPO

El gen PAH se localiza en humanos en la región q22-q24.1 del cromosoma 12. Tiene una longitud total de 171 kb y contiene 13 exones (Figura 3). Su transcripción está regulada por múltiples factores como los glucocorticoides, el AMPc, hormonas y el HNF-1 mediante secuencias específicas presentes en la región del promotor. Hasta el momento se han identificado a nivel mundial 532 mutaciones asociadas a PKU, aunque continuamente se hallan nuevas variantes alélicas. La mayoría son mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (missense), aunque también las hay de tipo unión intrón-exón (splice), sin sentido o stop (nonsense) y silentes, así como mayores mutaciones como deleciones o inserciones (<http://www.pahdb.mcgill.ca>).

Se han identificado mutaciones en todos los exones, pero la mayoría se localiza en el exón 7, probablemente por tratarse de una región altamente conservada del dominio catalítico de la enzima. Existe un porcentaje entre el 1 y el 10% de alelos PKU que no han podido ser caracterizados y que afectan a la región del promotor, a señales de poliadenilación, a regiones intrónicas o son deleciones no detectables por las técnicas habituales de estudio de mutaciones. El mecanismo más frecuente a través del cual las mutaciones del gen PAH ejercen sus efectos patogénicos es la inestabilidad conformacional de la proteína, lo que la confiere menor solubilidad, menor estabilidad térmica y mayor predisposición a la degradación proteolítica. Los estudios de expresión in vitro han permitido en muchos casos correlacionar el defecto funcional de las mutaciones con el fenotipo de los pacientes. Las mutaciones que confieren una actividad residual alta in vitro están generalmente asociadas a los fenotipos más suaves. La presencia en homocigosis de mutaciones con actividad residual in vitro nula o muy reducida se correlaciona con los fenotipos más graves de la enfermedad. Sin embargo, existen mutaciones para las que no se observa una relación entre la actividad residual observada in vitro y el fenotipo del paciente. También hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes son heterocigotos para distintas mutaciones, y que el fenotipo clínico y bioquímico final depende de la interacción entre las proteínas resultantes de ambos alelos. Además se han descrito pacientes, incluso hermanos, con un mismo genotipo pero diferentes fenotipos clínicos. Esta inconsistencia genotipo-fenotipo impide, hasta ahora, predecir con total fiabilidad la gravedad del fenotipo en los pacientes PKU a partir del genotipo.

5- MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA DEFICIENCIA DE FENILALANINA HIDROXILASA

5.1.- Clínica de la Fenilcetonuria

La manifestación clínica más importante de la PKU es una alteración en el desarrollo cognitivo que puede llegar a ser extremadamente intensa, con automutilaciones y trastornos psiquiátricos semejantes a la esquizofrenia. Los mecanismos a través de los cuales el incremento en los niveles de fenilalanina causan la muerte neuronal no se conocen con exactitud, aunque existen evidencias en animales que sugieren que se puede producir una alteración en la mielinización y en la diferenciación celular, así como una inhibición en el transporte proteico a través de la barrera hematoencefálica

que ralentizaría la síntesis de proteínas y neurotransmisores a nivel del sistema nervioso central.

El daño producido por la hiperfenilalaninemia no se manifiesta de forma aguda, sino que es necesario un acúmulo prolongado o reiterativo para que se puedan observar las alteraciones neurológicas. Por este motivo los pacientes PKU son clínicamente normales hasta el final de la lactancia, en la que se comienza a apreciar su retraso psicomotor. Asimismo, en pacientes que abandonan el tratamiento, no se producen descompensaciones agudas y los síntomas neurológicos no se expresan hasta meses o años después. En la resonancia magnética cerebral (RMC) sólo se aprecian las lesiones típicas de hiperintensidad en sustancia blanca periventricular en T2 cuando los niveles de fenilalanina se han mantenido por encima de $660 \mu\text{mol/L}$ (11 mg/dl) al menos durante 6 meses.

El grado de afectación del sistema nervioso central es muy variable y depende de los niveles de fenilalanina que tenga el paciente y que son el resultado del grado de actividad residual de PAH, del tipo de dieta que siga el paciente, de la absorción de fenilalanina a nivel intestinal, del grado en el que cruza la barrera hematoencefálica, de la presencia de procesos intercurrentes, etc. Los resultados son también heterogéneos ya que no se pueden olvidar todos los demás factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo cognitivo de una persona.

Los niveles de fenilalanina a partir de los cuales hay riesgo de daño neurológico han sido y son motivo de controversia. Muchos grupos utilizan niveles de $600 \mu\text{mol/L}$ (10 mg/dl) como corte por encima del cual se debe tratar a los pacientes, pero se han descrito alteraciones cognitivas menores tales como hiperactividad o dificultades en el aprendizaje en pacientes con valores de fenilalanina inferiores. Actualmente se tiende a intentar mantener los niveles de fenilalanina lo más cerca posible de la normalidad ($<120 \mu\text{mol/L}$), sobre todo durante la infancia temprana. Posteriormente se admiten como aceptables niveles más altos con el fin de permitir cierta relajación de la dieta. Cada país ha desarrollado su propio protocolo para el seguimiento de la fenilcetonuria. Como se puede observar en la Tabla 2, no hay consenso en cuanto a los valores máximos de fenilalanina que se consideran adecuados a cada edad, y estos pueden ser muy variables.

	Niveles de Fenilalanina
Inicio tratamiento	>360 umol/L (>6mg/dl)
0-6 años	<360 umol/L (<6mg/dl)
6-9 años	<540 umol/L (<9mg/dl)
9-12 años	<630 umol/L (<10,5mg/dl)
> 12 años	<630 umol/L (<10,5mg/dl)
Embarazo	<240 umol/L (<4mg/dl)

Tabla 2: Niveles plasmáticos de fenilalanina utilizados como referencia para tomar la decisión de tratar y posteriormente mantener a lo largo de la vida según las indicaciones de los protocolos utilizados en distintos países, se muestra los valores consensuados en España.

En nuestro país, el Ministerio de Salud de la Nación (MSN), recomienda que un buen control metabólico implica mantener concentraciones plasmáticas entre **2 y 6mg/dl** (120-360 uM/L) en los primeros años de vida, en los niños mayores hasta 8mg/dl (485 uM/L) y en adultos hasta 10mg/dl (600 uM/L).

Se ha establecido que todo niño que presente concentraciones de Fenilalanina por encima de 10mg/dl, tirosina normal o disminuida y que esté recibiendo alimentación normal, debe iniciar dieta restringida en Fenilalanina. Niños con concentraciones entre 6 y 10mg/dl y que persisten luego de 1 mes de dieta normal, también requieren de restricción dietaria.

La edad a la que se produce el acúmulo de fenilalanina parece tener también una importancia crucial para determinar el grado de afectación neurológica. Los primeros meses de vida el cerebro humano completa su proceso de crecimiento y diferenciación, y es en este periodo en el que la hiperfenilalaninemia produce mayores trastornos, produciendo retrasos cognitivos que pueden llegar a ser muy severos. En niños mayores y adolescentes, dejar el tratamiento los predispone a sufrir dificultades en el aprendizaje. En cambio, un paciente adulto puede abandonar la dieta sin sufrir síntomas o reduciéndose éstos a falta de concentración o irritabilidad, aunque ocasionalmente se han descrito cambios importantes del comportamiento y paranoias. Para evitar los síntomas se recomienda mantener el tratamiento durante toda la vida.

Asimismo, la capacidad de recuperación del daño cerebral depende de la edad a la que se instaure el tratamiento, consiguiendo mayores beneficios cuanto más precoz sea. Para evitar completamente la afectación neurológica es necesario comenzar el tratamiento durante el periodo neonatal. Cuando el diagnóstico es tardío se observa

cierta mejoría de la capacidad intelectual, el comportamiento y la sociabilidad si se trata a estos pacientes, pero en estos casos siempre se mantiene alguna limitación. Actualmente se tiende a iniciar el tratamiento incluso en pacientes de edades avanzadas. Las lesiones observadas en la resonancia magnética desaparecen si se mantiene el tratamiento durante al menos un año, aunque puedan persistir las secuelas neurológicas.

Las alteraciones cutáneas y el olor a ratones se presentan cuando los niveles de fenilalanina en sangre son superiores a $900 \mu\text{mol/L}$ (15mg/dl), y son rápidamente reversibles al disminuir esas cifras.

5.2.- Hiperfenilalaninemia Benigna (Hyperphenylalaninemia o HPA, Mild Hyperphenylalaninemia o MHP)

Antes de disponer del diagnóstico genético se describió esta enfermedad como una entidad diferenciada de la fenilcetonuria. Se trata de pacientes que tienen niveles de fenilalanina en sangre ligeramente elevados por encima de la normalidad (entre 120 y $600 \mu\text{mol/L}$), a pesar de lo cual su desarrollo psicomotor es normal y no requieren tratamiento dietético. Posteriormente se ha visto que en realidad se trata de pacientes con mutaciones en el gen PAH, pero cuyas enzimas resultantes mantienen una alta actividad residual. Esto permite un catabolismo de la fenilalanina cercano a la normalidad, impidiendo el acúmulo excesivo de fenilalanina y su neurotoxicidad. En muchas clasificaciones sigue apareciendo por tradición esta entidad como una enfermedad diferenciada, pero ya que se trata de una deficiencia en la función de la PAH, nosotros la denominaremos fenilcetonuria con fenotipo benigno.

A pesar de su aparente benignidad, se ha descrito en estos pacientes alteraciones menores del comportamiento tales como hiperactividad con mayor frecuencia que en la población normal. Asimismo, la falta de diagnóstico de estos casos puede dar lugar a síndromes de hiperfenilalaninemia materna en los hijos de las mujeres afectadas. También es necesario realizar el diagnóstico de estos niños para poder dar a sus familias un consejo genético adecuado, ya que pueden ser portadores de mutaciones más severas y tener en su descendencia o entre sus familiares casos de fenilcetonuria clásica.

5.3.- Síndrome de Hiperfenilalaninemia Materna

Unos niveles elevados de fenilalanina en la sangre de la madre durante el desarrollo intrauterino de sus hijos no sólo tienen efectos devastadores a nivel cerebral, sino que pueden dar lugar a malformaciones cardíacas y renales. También son frecuentes en estas mujeres los abortos de repetición. La homeostasis de la fenilalanina hasta la semana 27 de gestación depende exclusivamente de la capacidad materna para metabolizarla, y por lo tanto son los hijos de madre PKU los que pueden verse afectados por este síndrome, independientemente de su propia capacidad funcional. Para evitar estas importantes complicaciones las madres deben seguir, desde el momento de la concepción, un estricto tratamiento que evite niveles superiores a 180 $\mu\text{mol/L}$ (3mg/dl). Se utilizan estos niveles porque se supone que el feto puede llegar a doblar los niveles maternos.

El Síndrome de Hiperfenilalaninemia Materna debe entrar en el diagnóstico diferencial de todo paciente con retraso mental de cualquier grado y/o microcefalia. Es importante tener en cuenta que para diagnosticarlo la única prueba útil es la determinación de los niveles de fenilalanina en la madre, y no en el niño.

6- DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA HIPERFENILALANINEMIA. DETECCION NEONATAL

La fenilcetonuria era una de las causas más frecuentes de retraso mental. En el momento en que se encontró un tratamiento para prevenir las alteraciones cognitivas si se iniciaba de forma precoz existía una razón para buscar de forma masiva pacientes PKU durante el periodo neonatal. Con este fin Guthrie y Susi desarrollaron en 1963 un método que permitía la determinación de fenilalanina con muestras de sangre del talón de recién nacidos. Los programas de detección precoz de esta enfermedad junto con los de hipotiroidismo congénito, son los más extendidos en países desarrollados. El método utilizado es variable, y se utilizan ensayos microbiológicos, cromatográficos, colorimétricos, fluorométricos, etc.

 Ver link de kits diagnósticos usados.

La fenilalanina se acumula en sangre y tejidos cuando existe una disfunción en su sistema de hidroxilación. Como ya se ha comentado anteriormente, la gran mayoría de los casos se deben a deficiencias de la enzima PAH, pero un pequeño porcentaje de pacientes sufren hiperfenilalaninemia como consecuencia de alteraciones en la

síntesis o regeneración de su cofactor, la BH₄. La tetrahidrobiopterina actúa no sólo como donante de electrones para la PAH, sino también para la tirosina hidroxilasa, la triptófano hidroxilasa y otra serie de enzimas (Figura 4), y su deficiencia afecta directamente la síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos.

Los pacientes con alteraciones en la síntesis o reciclaje de la BH₄ tienen una afectación neurológica más severa que los pacientes fenilcetonúricos, con distonías, alteraciones de motilidad ocular, hipoglucemias y trastornos del control de temperatura desde el periodo neonatal, y no responden clínicamente aunque sí disminuyen los niveles de fenilalanina en sangre al tratamiento dietético habitual de la fenilcetonuria.

Históricamente se denominó a estos procesos en conjunto Hiperfenilalaninemia Maligna. Su tratamiento consiste en aportes exógenos de BH₄, L-Dopa y 5-OH-Triptófano pero su evolución no es tan satisfactoria como el de la fenilcetonuria. Los protocolos de diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia deben ir encaminados a la diferenciación de cada defecto enzimático para poder instaurar un tratamiento acertado a cada caso de forma precoz, poder predecir la evolución de los pacientes con mayor precisión y poder ofrecer un consejo genético adecuado.

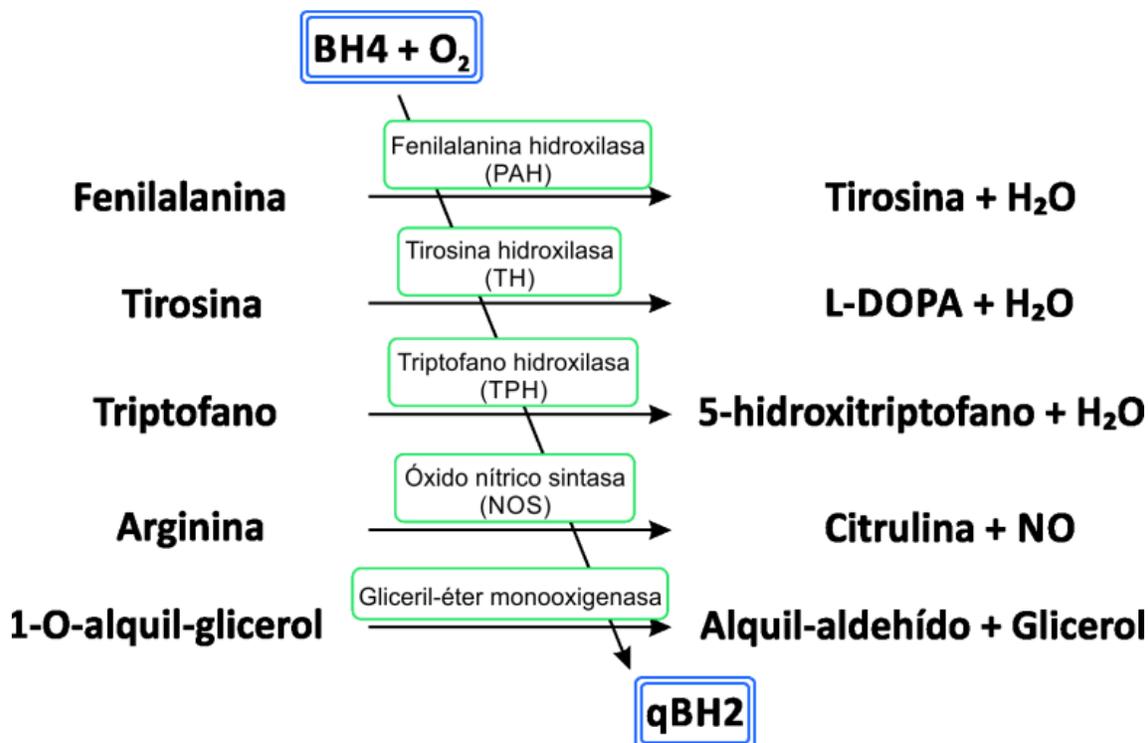


Figura 4: Reacciones enzimáticas mediadas por BH₄: 1) Fenilalanina hidroxilasa; 2) Tirosina hidroxilasa; 3) Triptófano hidroxilasa; 4) Óxido nítrico sintetasa; 5) Gliceril-éter-monooxigenasa. BH₄: tetrahidrobiopterina. q-BH₂: quinonoil dihidrobiopterina (tomado de Blau et al, 2001).

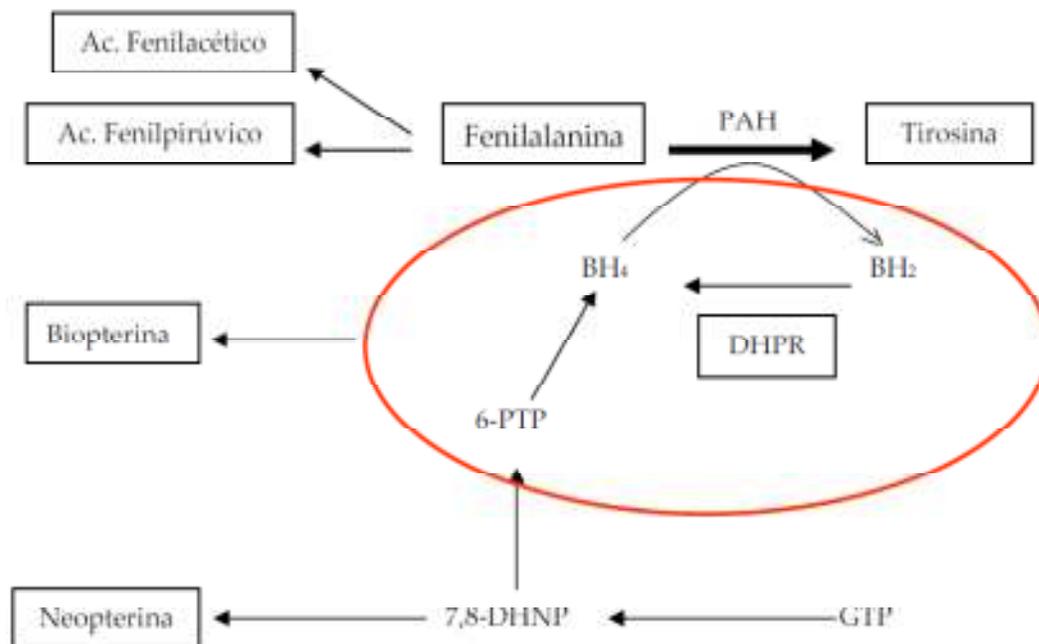


Figura 5a: Diagnóstico diferencial de la hiperfenilalaninemia. En recuadro se representan las sustancias medidas para realizar dicho diagnóstico: fenilalanina y tirosina en plasma, actividad DHPR en sangre, ácidos orgánicos derivados del exceso de fenilalanina en orina, así como las pterinas. Estas últimas son subproductos de la síntesis de BH₄ y se dividen en neopterinas (procedentes de la degradación de la 7,8-DHNP) y biopterinas (procedentes de la degradación de sepiapterina, BH₄ y BH₂). Los pacientes con deficiencia de la PCD presentan un aumento de la excreción de primapterina (procedentes de la degradación de la HO-BH₄)

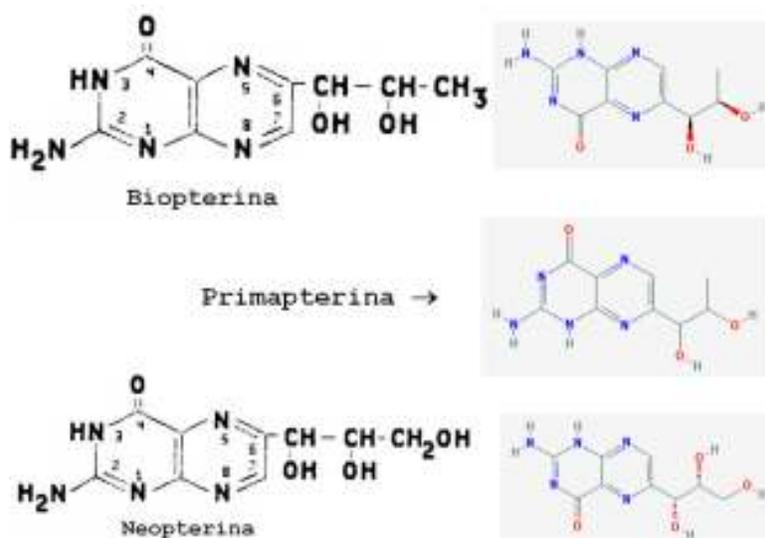


Figura 5b: Estructuras químicas de los productos excretados por orina

7- TRATAMIENTO DE LA FENILCETONURIA

El objetivo del tratamiento de la fenilcetonuria es mantener los niveles de fenilalanina plasmáticos por debajo de unos niveles considerados peligrosos para el desarrollo y función cognitiva del paciente (ver tabla 2). En 1993 el Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria de Inglaterra y la Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM), establecen que todo paciente con unos valores en sangre superiores a 360 $\mu\text{mol/L}$ (6 mg/dl) debe ser tratado. Como ya hemos comentado con anterioridad, los niveles tomados como referencia en los distintos países para tomar la decisión de tratar o no pueden diferir.

En España, los pacientes con niveles mantenidos entre 120 y 360 $\mu\text{mol/L}$ (2-6 mg/dl) se considera que tienen un fenotipo benigno y que no requieren tratamiento aunque sí deben ser monitorizados para valorar la aparición de alteraciones neurológicas menores o evitar el síndrome de hiperfenilalaninemia materna.

El tratamiento habitual de la fenilcetonuria consiste en una limitación en la ingesta de fenilalanina. Ya que la fenilalanina es un aminoácido esencial, la restricción de su ingesta reduce la cantidad que llega al sistema catabólico donde actúa la PAH, pero es indispensable abastecer adecuadamente al organismo para la biosíntesis de proteínas endógenas. Para que el tratamiento tenga éxito debe iniciarse en los primeros meses de la vida y mantenerse durante el desarrollo hasta la madurez, aunque actualmente se recomienda mantenerlo durante toda la vida. La dieta, los niveles de fenilalanina, y el desarrollo psicomotor y general de cada paciente debe monitorizarse de forma individual y prolongada, ya que las necesidades terapéuticas se deben adaptar a cada etapa evolutiva.

La cantidad de fenilalanina que cada paciente puede tolerar en su dieta depende de la actividad residual de PAH que tenga. En 1980 Güttler estableció unos fenotipos según la tolerancia a fenilalanina que se han mantenido con escasas variaciones hasta la actualidad. Según esta clasificación, los pacientes fenilcetonúricos que requieren tratamiento pueden tener un fenotipo suave, moderado y severo (o grave). En la Tabla 3 se especifican los distintos fenotipos, con su tolerancia, y la frecuencia de cada uno de ellos en la población española. Esta clasificación utiliza la tolerancia a fenilalanina a los 5 años de edad, ya que los requerimientos de fenilalanina varían según las necesidades para el crecimiento y por lo tanto disminuyen

progresivamente. Esto supone que hasta que el paciente no alcanza los 5 años, no puede ser catalogado adecuadamente.

	Tolerancia a fenilalanina ^a (mg/Kg/día)	Tolerancia media a fenilalanina ^a (mg/día)	Frecuencia en España ^b
PKU grave	< 20	250 - 350	15,7%
PKU moderada	20 - 25	350 - 400	9,0%
PKU suave	25 - 50	400 - 600	23,0%
HFA ó MHP	> 50	> 600	52,3%

a) según Güttler, 1980; Güttler y Guldberg, 1996.

b) según Desviat et al, 1999.

Tabla 3- Clasificación de los pacientes con deficiencia de PAH según la tolerancia a fenilalanina a los 5 años de edad, junto con la frecuencia de estos fenotipos en la población española.

La fenilalanina forma parte de todas las proteínas de origen natural, de las cuales supone aproximadamente un 5%. La mayoría de los grupos recomienda restringir todas las proteínas naturales en mayor o menor grado, según la tolerancia de cada paciente

La restricción en la ingesta de proteínas naturales para evitar un incremento en los niveles de fenilalanina conlleva una restricción en la ingesta de otros aminoácidos, vitaminas y oligoelementos. Para evitar la aparición de patología carencial secundaria es necesario suplementar la dieta de los pacientes con productos industriales que contengan estos nutrientes. Con este fin se han desarrollado múltiples fórmulas de aminoácidos exentas de fenilalanina y enriquecidas en tirosina que cumplen todos los requisitos

8- SEGUIMIENTO CLINICO Y BIOQUIMICO DE LOS PACIENTES FENILCETONURICOS

Todos los pacientes deben ser evaluados clínica y bioquímicamente de forma periódica para adaptar la dieta a sus niveles de fenilalanina, permitir un adecuado crecimiento y desarrollo psicomotor y evitar la aparición de patología carencial. Es importante realizar periódicamente una evaluación neurológica y psicológica completa y valorar la realización de pruebas de imagen y de neurofisiología.

El número de controles clínicos y analíticos debe hacerse de forma individualizada, dependiendo de la evolución de cada paciente. En los primeros años de la vida y en mujeres embarazadas se debe realizar un seguimiento exhaustivo, mientras que en fenotipos suaves y en adultos puede no ser tan estricto. En España se siguen las

directrices del Protocolo de Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento de las Hiperfenilalaninurias propuesto por la AECOM y que se expone de forma resumida en la Tabla 4.

	0 – 6 meses	6 – 24 meses	> 24 meses	Embarazo
Nivel de Phe	Semanal	Quincenal	Mensual	Semanal
Análítica general	Diagnóstico	Anual	Anual	Inicio y fin
Control clínico	Mensual	Trimestral	Bianual	Mensual
Control neurológico	Cada 2-3 años.			
Control psicológico	18 meses, 3, 6, 9 años y final (12-14 años).			
RM cerebral	Sólo si mal control de los niveles de fenilalanina.			

Tabla 4.- Controles clínicos y bioquímicos recomendados por la AECOM (España) para el seguimiento de pacientes PKU. Los controles pueden verse modificados según la evolución de cada paciente.

9- RESPUESTA A TETRAHIDROBIOPTERINA (BH₄) EN PACIENTES PKU

La tetrahydrobiopterina es un cofactor perteneciente al grupo de las pterinas, estructuralmente está constituida por una cadena de pteridina con las sustituciones 2-amino, 4 oxo y 5,6,7,8 tetrahidro. En humanos la BH₄ se encuentra en todos los tejidos y fluidos biológicos y puede ser tanto reciclada como sintetizada de novo a partir de GTP, (Figura 1). La BH₄ actúa como cofactor de la óxido nítrico sintasa y de la gliceril eter monooxigenasa aunque la función mejor establecida y más estudiada para la BH₄ en humanos es su actuación como cofactor de tres enzimas implicadas en la hidroxilación de aminoácidos aromáticos; la fenilalanina-4-hidroxilasa, la tirosina-3- hidroxilasa y la triptófano-5-hidroxilasa, estas enzimas son claves en la biosíntesis de aminas biógenas.

En las hiperfenilalaninurias para distinguir las deficiencias producidas por defectos en la síntesis o regeneración del cofactor BH₄ (Figura 5) de las debidas a defectos en el gen de la PAH se realiza un test de **sobrecarga oral con BH₄**, aunque para un diagnóstico exacto es necesario además el análisis de los niveles de pterinas en la orina y la actividad dihidropterina reductasa en eritrocitos. En general, los pacientes con alteraciones en las enzimas implicadas en la síntesis y regeneración de la BH₄ presentan una normalización de los niveles de L-Phe plasmática muy rápida (4-8 horas después de la sobrecarga) tras la ingesta oral de dosis moderadas de este cofactor (Figura 6).

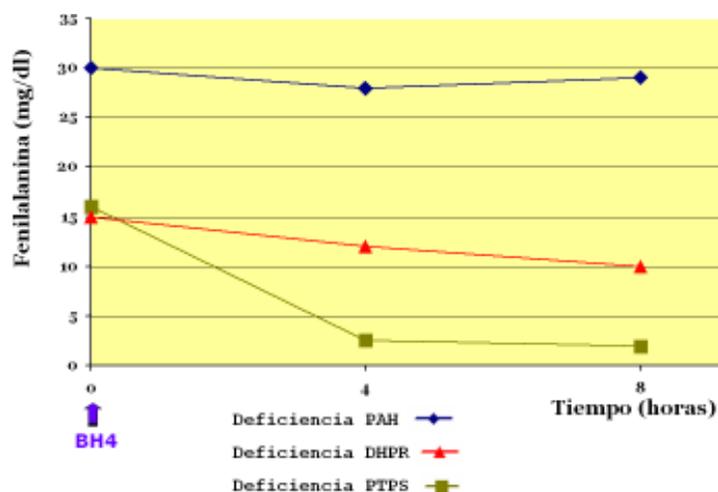


Figura 6: Una sobrecarga de BH₄ de 8 a 24 horas con **20 mg/kg/d** se ha utilizado principalmente en recién nacidos que dan positivo en PKU para detectar deficiencias tempranas de BH₄. Además, esta prueba puede detectar pacientes con PKU que responden a BH₄. La prueba se realiza en la primera cita para el recién nacido después de que se hayan tomado muestras de sangre basal de PHE, tirosina y biopterina. Este es un enfoque práctico porque, durante el período neonatal, los niveles de PHE son altos y los pacientes siguen una dieta normal. La concentración de PHE debe determinarse a las 4, 8 y 24 horas después de la carga oral de BH₄. La prueba solo es valiosa si es positiva.

Niveles de fenilalanina plasmática antes y después de una sobrecarga en un paciente con deficiencia en PAH, uno con deficiencia en PTPS y un caso de deficiencia en DHPR. Considerando niveles plasmáticos en rango terapéutico (Scriver and Kaufman 2001) normalmente por debajo de 7 mg/dl (400 μM).

PAH: Fenilalanina hidroxilasa;

DHPR: dihidropteridina reductasa;

PTPS: 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina sintasa

La tetrahydrobiopterina actúa como cofactor de la enzima PAH induciendo cambios conformacionales en su centro activo y regulador. En el año 1983, los laboratorios Shircks, en Suiza, comenzaron a producir una tetrahydrobiopterina sintética (6-metil-tetrahydrobiopterina), con capacidad para interactuar con el centro activo pero sin inhibir el centro regulador debido a las diferencias en su cadena lateral. Este producto estaba pensado para el tratamiento de los pacientes con deficiencia del cofactor, y era el utilizado en las sobrecargas orales de BH₄ en neonatos.

Históricamente, la realización de sobrecargas orales de BH₄ estaba restringida a aquellos casos en los que era necesario hacer un diagnóstico diferencial entre las deficiencias de PAH y los defectos en la síntesis del cofactor. Los pacientes con defectos en la síntesis de BH₄ tienen una rápida normalización de los niveles de fenilalanina plasmática tras la ingesta oral de dosis moderadas de BH₄ (aproximadamente 4 horas después de la administración de 2,5-10 mg/Kg). Sin embargo, ante posibles errores en el diagnóstico de pacientes con deficiencia de DHPR y coincidiendo con una mejora en la comercialización del producto, se recomendó a partir de 1993 la administración de dosis superiores de BH₄ (hasta 20 mg/kg) en los protocolos diagnósticos.

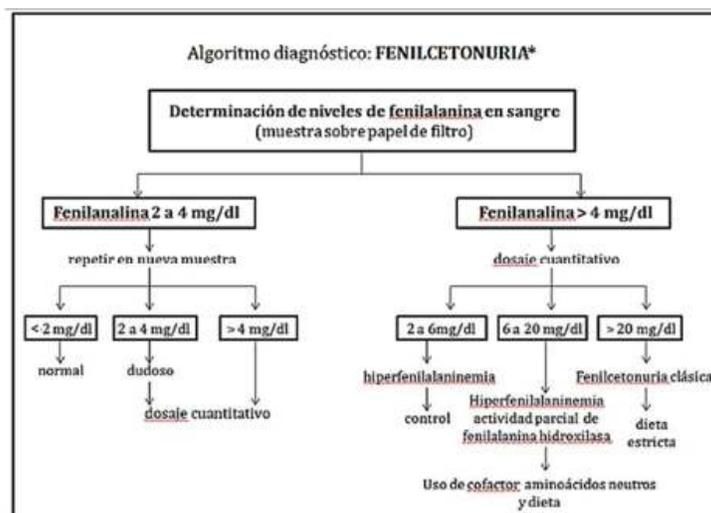
La heterogenicidad en la clasificación de los pacientes y en el tipo de protocolo utilizado para valorar la respuesta a BH4 (dosis, edad, tiempo de observación, dieta concomitante, grado de respuesta considerado positivo, etc) hace difícil establecer comparaciones entre los estudios disponibles.

En algunos casos el tratamiento exclusivo con BH4 permite seguir una dieta completamente normal. Salvo un caso de irritación local tras su administración sublingual, no se han descrito efectos secundarios. También se ha postulado su utilidad para evitar el síndrome de hiperfenilalaninemia materna, pero la falta de experiencia obliga a ser cautos en cuanto a los posibles efectos teratogénicos de la BH4. En el único caso descrito de su utilización en una mujer embarazada, se ha utilizado con éxito.

En los últimos años, la implicación de la tetrahidrobiopterina en el metabolismo del óxido nítrico ha hecho que se proponga como tratamiento en campos tan dispares como la sepsis, las miocardiopatías y las alteraciones del endotelio vascular, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer, enfermedades genitourinarias como la criptorquidia, etc. La tetrahidrobiopterina sintética utilizada comercialmente es el dihidroclorato de sapropterina.

10- ALGORITMO

El programa de fortalecimiento de la detección precoz de enfermedades congénitas, del ministerio de salud de la nación presenta algoritmo para la pesquisa de fenilcetonuria.



Resultados de la pesquisa neonatal a nivel nacional periodo 2006-2018:

Patología	Total	Incidencia
Fenilcetonuria (PKU)	73	1: 41.842
Hiperfenilalaninemia (HPA)	42	1: 72.725
PKU+HPA	115	1: 26.561

ALGORITMO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LA DEFICIENCIA DE PKU Y BH4

Un algoritmo aconsejable para el diagnóstico diferencial es el de la figura 7 y tabla 5.

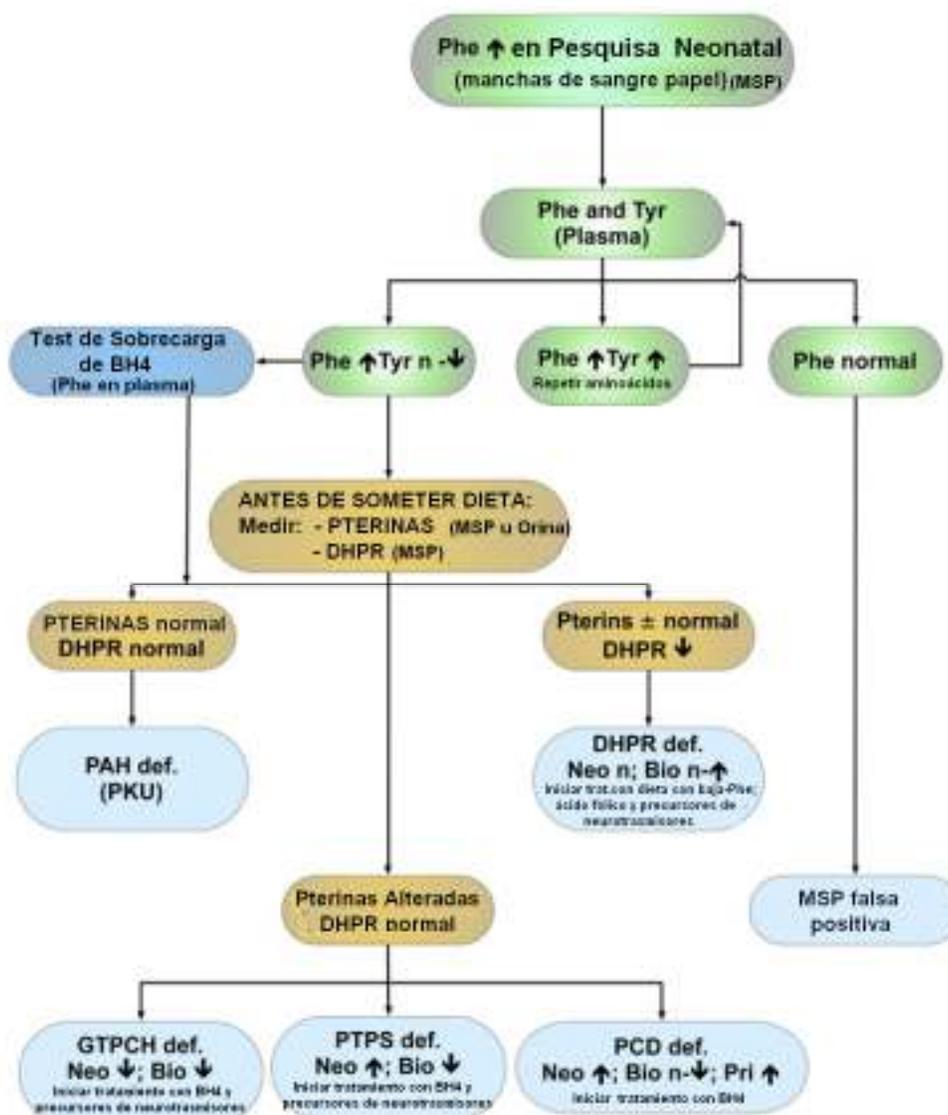


Figura 7: Algoritmo diagnóstico diferencial entre la deficiencia de PKU y BH4 (modificada de Opladen y col.). Las manchas de sangre secas y muestras de orina puede ser usadas para la determinación diferencial basados en los niveles de neopterina (Neo), biopterina (Bio), y primapterina (Pri) y la actividad de la enzima *Dihidropteridina reductasa* (DHPR) en MSP.

En la Deficiencia de GTP ciclohidrolasa (GTPCH): Hay niveles bajos o no detectables de Neopterina y Biopterina.

En la deficiencia de 6- piruvil tetrahidropterina sintasa (PTPS): Hay altos niveles de Neopterina y bajos o no detectables de Biopterina.

En la Deficiencia de dihidropteridina reductasa (DHPR): Hay niveles normal de neopterina y normal o elevado de biopterina y ausencia de actividad de DHPR.

En la deficiencia de 4 α carbinolamina tetrahidrobiopterina deshidratasa (PCD): hay niveles elevados de neopterina y primapterina y bajo-normal de biopterina.

Tabla 5: Parámetros bioquímicos para el diagnóstico diferencial de la deficiencia PKU y BH4

	Neopterina	Biopterina	Primapterina	Actividad DHPR	Phe
PKU	n- ↑	n- ↑	n	n	↑
GTPCH	↓	↓	n	n	↑ ^a
PTPS	↑	↓	n	n	↑
PCD	↑	↓-n	↑	n	↑
DHPR	n	n-↑ ^a	n	↓	↑

NUEVOS TRATAMIENTOS:

- KUVAN

Desde el año 2017 se ha aprobado el tratamiento con Kuvan (dihidrocloruro de sapropterina, equivalentes a 77 mg de sapropterina).

Kuvan está indicado para el tratamiento de la hiperfenilalaninemia (HPA) en pacientes adultos y pediátricos de cualquier edad que padecen deficiencia de tetrahidrobiopterina (BH4) o con fenilcetonuria (PKU) y que han mostrado responder a este tipo de tratamiento.

- PALYNZINQ

El pasado 24-5-2018 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos aprobó la distribución de un nuevo fármaco que puede ayudar a los pacientes que sufren fenilcetonuria (PKU) a reducir su nivel de fenilalanina (Phe) en sangre hasta el recomendado entre 2 y 6 mg/dL. Este nuevo fármaco, llamado Palynziq, es una enzima pegvaliasa-pqpz (pegylated recombinant phenilalanina ammonial lyase o “PEG-PAL”) y actúa como sustituto de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Cuando se inyecta subcutáneamente reduce los niveles de Phe en sangre.

La aprobación de Palynziq para el consumo humano se ha basado en los resultados de dos ensayos clínicos sobre pacientes con hiperfenilalaninemia: uno abierto (el sujeto conoce tanto el fármaco como la dosis que se le administra), en el que se inyectaron 20 o 40 mg al día, y uno con placebo, en el que se estudió el rechazo al medicamento en pacientes previamente

tratados con Palynziq. Ambos ensayos mostraron que, aunque Palynziq reducía significativamente los niveles de Phe en sangre en la mayoría de los casos, también en algunos producía reacciones adversas. El efecto secundario más grave fue la anafilaxis, que apareció en algunos sujetos al aumentar la dosis. Debido al riesgo de anafilaxis el prospecto de Palynziq incluye una advertencia y se ha limitado la distribución del medicamento a un programa restringido y regulado por una Estrategia de Evaluación y Mitigación del Riesgo (REMS). Este programa exige a los médicos realizar un curso sobre el medicamento y prescribir epinefrina autoinyectable, a las farmacias estar certificadas por el programa y a los pacientes incorporarse al mismo, ser educados sobre los riesgos de Palynziq antes de poder utilizarlo y llevar epinefrina autoinyectable en todo momento, en caso de que se produzca una reacción de anafilaxis.

BIBLIOGRAFIA:

- **Charles R. Scriver: The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift.** 2007. *Human Mutation* 28(9), 831-845.
- **Nenad Blau, Julia B. Hennermann, Ulrich Langenbeck, Uta Lichter-Konecki** (2011) Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism* 104 S2–S9
- **Martínez-Pardo M; Bélanger-Quintana A; García Muñoz MJ; Desviat L; Pérez B; Ugarte M.** FENILCETONURIA. Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. AECOM.
- **Charles R. Scriver.** 2008. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter "Inborn Errors of Metabolism": Albinism, alcaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inher Metab Dis* 31: 580–598
- **Charles R. Scriver, Paula J. Waters.** 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *TIG* 15, (7): 267-272
- **Hillert A, Anikster Y, Belanger-Quintana A, et al.** The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *Am J Hum Genet.* 2020;107(2):234-250. doi:10.1016/j.ajhg.2020.06.006
- **PESQUISA NEONATAL ARGENTINA.** Programa Nacional de Fortalecimiento de la Detección Precoz de Enfermedades Congénitas: Manual de procedimientos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. 2011. Páginas: 1-138.
- **Aprobación FDA de Palynziq:**
<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm608835.htm>